

REC'D 03 SEP 2003	
RECEIVED	PCT

10/525679
PCT/KR 03/01641 #2
RO/KR 14.08.2003
Rec'd PCT/PTO 17 FEB 2005

대한민국 특허청
KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

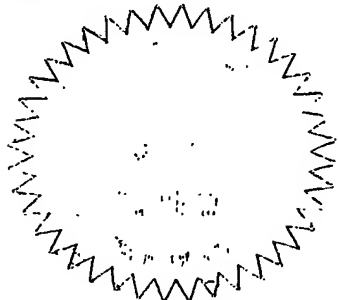
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto is a true copy from the records of the Korean Intellectual Property Office.

출원번호 : 10-2002-0048683
Application Number

출원년월일 : 2002년 08월 17일
Date of Application AUG 17, 2002

출원인 : 서해영
Applicant(s) SUH, HAE YOUNG



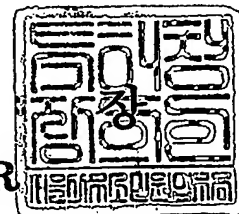
2003 년 07 월 30 일

특 허 청

COMMISSIONER

PRIORITY
DOCUMENT

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



BEST AVAILABLE COPY

【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.08.19
【제출인】	
【성명】	서해영
【출원인코드】	4-2002-027402-1
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2002-058930-9
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2002-058927-1
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2002-0048683
【출원일자】	2002.08.17
【발명의 명칭】	간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-02-0265062-74
【접수일자】	2002.08.17
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명】	서해영
【출원인코드】	4-2002-027402-1

【발명자】**【성명의 국문표기】**

김성수

【성명의 영문표기】

KIM, Sung-Soo

【주민등록번호】

671111-1654228

【우편번호】

134-033

【주소】

서울특별시 강동구 성내3동 419-13 동아1차아파트 1007호

【국적】

KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

김지원

【성명의 영문표기】

KIM, Ji-Won

【주민등록번호】

750214-2408827

【우편번호】

442-380

【주소】

경기도 수원시 팔달구 원천동 38-26 캠퍼스빌 702

【국적】

KR

【발명자】**【성명의 국문표기】**

이영돈

【성명의 영문표기】

LEE, Young-Don

【주민등록번호】

551217-1029517

【우편번호】

442-070

【주소】

경기도 수원시 팔달구 인계동 선경3차아파트 301-504

【국적】

KR

【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인
이현실 (인) 대리인
장성구 (인)

【수수료】**【보정료】**

0 원

【기타 수수료】

원

【합계】

0 원

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2002.08.17
【발명의 명칭】	간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법
【발명의 영문명칭】	A METHOD FOR TRANSDIFFERENTIATING MESENCHYMAL STEM CELLS INTO NEURAL CELLS
【출원인】	
【성명】	서해영
【출원인코드】	4-2002-027402-1
【대리인】	
【성명】	이현실
【대리인코드】	9-1999-000366-5
【포괄위임등록번호】	2002-058930-9
【대리인】	
【성명】	장성구
【대리인코드】	9-1998-000514-8
【포괄위임등록번호】	2002-058927-1
【발명자】	
【성명】	서해영
【출원인코드】	4-2002-027402-1
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김성수
【성명의 영문표기】	KIM, Sung-Soo
【주민등록번호】	671111-1654228
【우편번호】	134-033
【주소】	서울특별시 강동구 성내3동 419-13 동아1차아파트 1007호
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김지원
【성명의 영문표기】	KIM, Ji-Won
【주민등록번호】	750214-2408827

【우편번호】	442-380
【주소】	경기도 수원시 팔달구 원천동 38-26 캠퍼스빌 702
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	이영돈
【성명의 영문표기】	LEE, Young-Don
【주민등록번호】	551217-1029517
【우편번호】	442-070
【주소】	경기도 수원시 팔달구 인계동 선경3차아파트 301-504
【국적】	KR
【발명자】	
【성명의 국문표기】	김승업
【성명의 영문표기】	KIM, Seung-Up
【주소】	경기도 수원시 팔달구 망포동 늘푸른백산아파트 114-201
【국적】	US
【취지】	특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 이현실 (인) 대리인 장성구 (인)
【수수료】	
【기본출원료】	20 면 29,000 원
【가산출원료】	11 면 11,000 원
【우선권주장료】	0 건 0 원
【심사청구료】	0 항 0 원
【합계】	40,000 원
【감면사유】	개인 (70%감면)
【감면후 수수료】	12,000 원
【첨부서류】	1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 염기성 나선-고리-나선(basic helix-loop-helix, bHLH) 계열의 전사인자(transcription factor)를 이용함으로써 간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)를 신경세포로 형질전환(transdifferentiation)시키는 방법 및 상기 간엽 줄기세포로부터 형질전환(transdifferentiation)되는 신경세포(neural cells)를 유효성분으로 하는 신경 질환에 대한 세포 치료용 조성물에 관한 것으로, 본 발명에 따라 간엽 줄기세포로부터 분화 및 증식된 신경세포는 파킨슨씨병, 알츠하이머, 뇌졸중 등의 뇌신경계 질환과 척수손상에 의한 장애 등을 치료하기 위한 세포 대체 요법과 유전자 치료요법에 이용되거나, 신약개발에 있어 약물효과 검정 또는 각종 연구를 위한 재료로 폭넓게 이용될 수 있다.

【대표도】

도 6

【명세서】

【발명의 명칭】

간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키는 방법{A METHOD FOR TRANSDIFFERENTIATING MESENCHYMAL STEM CELLS INTO NEURAL CELLS}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 인간 골수로부터 분리하여 시험관내(*in vitro*)에서 배양한 간엽 줄기세포의 형태를 배양 1일, 2일, 3일, 7일 후 광학현미경상에서 촬영한 사진이고,

도 2A 내지 도 2D는 간엽 줄기세포의 지방세포, 연골세포 및 뼈세포로의 분화능을 확인한 사진으로, 도 2A는 오일 레드 O에 의해 염색된 지방세포이고, 2B는 알시안 블루로 염색된 연골세포이고, 2C와 2D는 각각 알칼라인 포스파타제와 본 코사로 염색된 뼈세포이고,

도 3은 신경 전사인자인 뉴로제닌 1(neurogenin 1; *ngn1*) 을 발현하는 레트로바이러스 벡터의 지도이고,

도 4는 뉴로제닌 1 유전자를 포함하는 레트로바이러스 벡터가 도입된 293T 세포의 세포질(Cyt)과 핵(Nu)에서 뉴로제닌 1의 발현을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과이고,

도 5는 뉴로제닌 1 유전자를 포함하는 레트로바이러스를 감염시킨 간엽 줄기세포의 세포질(Cyt)과 핵(Nu)에서 뉴로제닌 1의 발현을 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과이고,

도 6은 시험관내(*in vitro*)에서 간엽 줄기세포와 뉴로제닌 1 유전자가 도입된 간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화를 신경세포의 마커인 NF200(neurofilament 200),

MAP2(microtubul-associated protein 2) 및 NeuN(neuronal nuclei)에 대한 항체를 이용하여 면역조직화학 염색법으로 확인한 결과이고,

도 7은 시험관내(*in vitro*)에서 뉴로제닌 1과 E47 또는 뉴로 D1와 E47 유전자가 도입된 간엽 줄기세포의 신경세포로의 분화를 신경세포의 마커인 NF-M(neurofilament-M) 및 NF200(neurofilament 200)에 대한 항체를 이용하여 웨스턴 블롯을 통해 확인한 결과이고,

도 8은 뉴로제닌 1 유전자가 도입된 간엽 줄기세포(MSC/Ngn1)와 도입되지 않은 간엽 줄기세포(MSC/lacZ) 각각을 흰쥐 뇌의 선조체(striatum)에 이식한 지 2주 후 이식율을 확인한 형광사진이고,

도 9는 뉴로제닌 1 유전자가 도입된 간엽 줄기세포를(MSC/Ngn1)와 도입되지 않은 간엽 줄기세포(MSC/lacZ) 각각을 흰쥐 뇌에 이식한 지 2주 후의 뇌절편에서 신경세포의 마커인 NeuN 및 성상세포(astocyte)의 마커인 GFAP의 존재여부를 면역조직화학 염색법으로 확인한 결과이고,

도 10은 도 9의 결과를 그래프로 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

- 11> 본 발명은 염기성 나선-고리-나선(basic helix-loop-helix, bHLH) 계열의 전사인자(transcription factor)를 이용함으로써 간엽 줄기세포(mesenchymal stem cells)를 신경세포로

형질전환(transdifferentiation)시키는 방법 및 상기 간엽 줄기세포로부터 형질전환되는 신경 세포를 유효성분으로 하는 신경 질환에 대한 세포 치료용 조성물에 관한 것이다.

- 2> 간엽 줄기세포는 일반적으로 골수(bone marrow)에서 조혈작용을 돕는 지지세포(stroma)로서, 뼈, 연골, 지방, 근육세포를 포함한 여러 가지 중배엽성 세포로 분화하는 능력을 지녔으며, 미분화상태를 유지하면서 쉽게 증식시킬 수 있는 특징이 있어 인공조직을 개발하기 위한 재료로서 그 사용가치가 매우 높다. 간엽 줄기세포 자체 또는 이로부터 분화된 세포들을 이용한 치료에 있어서는, 간엽 줄기세포를 환자 자신으로부터 채취하거나 혈액은행의 데이터베이스를 이용하여 HLA(human leukocyte antigen) 타입이 일치되는 골수로부터 분리하여 사용함으로써 개체간의 면역거부반응을 최소화시킬 수 있다.
- 3> 최근 간엽 줄기세포가 뇌에서 신경교세포로 분화하는 잠재력을 지닌 것으로 알려지면서 (Azizi., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4080-4085(1998); 및 Kopen., et.al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 10711-10716(1999)) 간엽 줄기세포를 이용하여 중추신경계의 질병을 치료할 수 있다는 가능성이 제기된 바 있으며(Li et al., *Neurosci. Lett.*, 315, 67-70(2001); 및 Chen., et al., *Stroke* 32, 1005-1011(2001)), 또한 간엽 줄기세포의 뇌조직으로의 분화능을 바탕으로, 분화과정을 재프로그래밍하여 신경세포로 분화시키는 기술의 개발 가능성이 높아지고 있다.
- 14> 미분화 세포들이 인공 신경세포를 만들기 위한 재료로서 각광을 받아 왔으나, 현재까지 알려진 대부분의 분화방법은 성장인자 또는 호르몬 등을 사용하는 것으로서 여러 가지 다른 세포가 생겨나는 것을 제어할 수 없다는 단점(Sanchez-Ramos., et al.,

Exp. Neurol., 164, 247-256(2000); Woodbury., et al., *J. Neurosci. Res.*, 61, 364-370(2000); 및 Deng., et al., *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 282, 148-152(2001))이 있으며, 이러한 현상은 동물모델에 뇌이식하였을 때 더욱 두드러진다는 문제점(Azizi., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94, 4080-4085(1998); 및 Kopen., et al., 96, 10711-10716(1999))이 있다. 따라서 간엽 줄기세포를 신경세포로 분화하도록 유도하는 직접적인 방법, 즉 신경세포로 전환시키는 전사인자(transcription factor)를 사용하는 방법 등이 요구되고 있는 실정이다.

- 15> 뉴로제닌(neurogenin), 뉴로 D(neuroD)는 신경계 형성에 핵심적인 역할을 하는 염기성 나선-고리-나선(basic helix-loop-helix, bHLH) 계열의 전사인자(transcription factor)로서 E12 혹은 E47과 같이 산재하여 존재하는 bHLH 구조의 단백질과 복합체를 이루어, E-box(CANNTG) 또는 드물게 N-box를 포함하는 DNA서열에 결합한다. 이러한 결합은 bHLH 구조의 전사인자들이 신경세포의 분화를 증진 시키는 조직 특이적인 유전자의 발현을 활성화하는데 필수적임이 밝혀져 있다(Lee, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 7, 13-20(1997))
- 16> 이에 본 발명자들은 인체에 존재하여 안정성이 높으면서도, 골수내에 존재하는 간엽 줄기세포를 효과적으로 신경세포로 분화시키는 물질을 탐색한 결과, 간엽 줄기세포에 뉴로제닌(Neurogenin) 또는 뉴로 D(neuroD)와 같은 bHLH 계열의 전사인자를 도입하여 이러한 전사인자를 지속적으로 발현하는 간엽 줄기세포를 제조하고 이를 동물모델의 뇌에 이식하였을 때 높은 비율로 신경세포로 분화되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 17> 따라서, 본 발명의 목적은 간엽 줄기세포로부터 신경세포로 형질전환시키는 방법을 제공하는 것이다.
- 18> 본 발명의 다른 목적은 신경세포로 분화되도록 처리된 간엽 줄기세포 또는 이로부터 분화된 신경세포를 유효성분으로 하는 신경 질환에 대한 세포 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- 19> 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 간엽 줄기세포에 존재하는 bHLH 계열 전사인자의 수준을 높임으로써 간엽 줄기세포를 신경세포로 분화 및 증식시키는 방법을 제공한다.
- 20> 또한, 본 발명의 방법에 의해 간엽 줄기세포로부터 분화되는 신경세포를 제공한다.
- 21> 또한, 본 발명의 방법에 의해 신경세포로 분화하도록 처리된 간엽 줄기세포 또는 이로부터 분화된 신경세포를 유효성분으로 하는, 신경 질환에 대한 세포 치료용 조성물을 제공한다.
- 22> 본 발명에서 bHLH 계열의 전사인자로는 신경형성 전사인자(neurogenic transcription factor)가 사용될 수 있으며, 신경형성 전사인자 유전자로는, 예를 들어, 뉴로제닌 1 유전자(Genbank Accession No.: U63842, U67776), 뉴로제닌 2 유전자(Genbank Accession No.: U76207, AF303001), 뉴로 D1 유전자(Genbank Accession No.: U24679, AB018693), MASH1 유전자(Genbank Accession No.: M95603, L08424), MATH3 유전자(Genbank Accession No.: D85845), E47 유전자(Genbank Accession No.: M65214, AF352579) 등의 염기서열 정보로부터 얻어지는 cDNA를 클로닝하거나 합성하여 사용할 수 있으며, 이와 동등하거나 유사한 활성을 나타낼 수 있다면 이들 서열의 일부가 변형, 결실, 치환된 것도 사용될 수 있다.

- 3> 본 발명에서 간엽 줄기세포는 인간을 포함한 모든 포유동물의 골수, 혈액(peripheral blood) 및 제대혈(cord blood)로부터 분리하여 사용할 수 있는데, 특히, 인간의 골수로부터 분리된 간엽 줄기세포가 바람직하며, 이 때 연령은 무관하다.
- 4> 본 발명에서 간엽 줄기세포에 존재하는 bHLH 전사인자의 수준을 높이는 방법으로는 bHLH 전사인자를 직접 또는 적절한 운반체를 이용하여 세포내로 도입할 수도 있지만, 보다 바람직하게는 상기 bHLH 전사인자 또는 그 활성절편을 발현하는 유전자를 상기 간엽 줄기세포로 도입하는 방법이 사용될 수 있다.
- 5> 상기에서 간엽 줄기세포에 bHLH 전사인자 또는 그 활성절편을 코딩하는 유전자를 도입하기 위해 DNA-칼슘 침전법, 리포솜을 이용하는 방법, 폴리아민 계열을 사용하는 방법, 일렉트로포레이션법(electroporation), 레트로바이러스를 이용하는 방법, 아데노바이러스를 이용하는 방법 등 당분야에 공지된 유전자의 세포내 도입기술 방법이 사용될 수 있다. 특히, 레트로바이러스를 이용하는 방법이 바람직한데, 예를 들어, bHLH 전사인자를 레트로바이러스 벡터에 삽입하여 발현벡터를 제작한 후, 이 벡터를 포장(packaging) 세포에 형질도입하고, 형질도입된 포장세포를 배양한 후 여과하여 레트로바이러스 용액을 얻고, 이를 이용하여 간엽 줄기세포를 감염시킴으로써 간엽 줄기세포에 bHLH 전사인자 유전자를 도입할 수 있다. 그 후, 상기 레트로바이러스 벡터에 포함된 선별마커를 이용하여 bHLH 전사인자 유전자가 도입되어 bHLH 전사인자를 지속적으로 발현하는 간엽 줄기세포를 수득할 수 있다.
- 36> 상기 bHLH 전사인자 유전자가 도입된 간엽 줄기세포는 뼈, 근육, 지방, 연골세포의 분화능은 억제되는 대신 신경세포의 잠재적 분화능을 갖게 되어, 시험관 내(in vitro)에서 특정한 조건에서 신경세포로 분화될 수 있으며, 실험동물의 뇌조직에 이식되었을 때는 효과적으로 신경세포로 분화된다. 상기에서 간엽 줄기세포의 분화능이 중배엽성 세포에로의 방향성으로부터

신경세포로 변환된다는 사실은 시험관내 실험을 통해 보다 확실하게 확인될 수 있는데, 예를 들어 포르스콜린 및/또는 5-아자데옥시시티딘을 상기 간엽 줄기세포에 처리함으로써 신경세포로의 분화를 확인할 수 있으며, 그 분화정도를 향상시킬 수 있다.

7> 구체적으로, 10 내지 30 μmol 농도의 포르스콜린(forskolin)을 처리하는 것이 바람직하며, 포르스콜린을 처리하기 전에 5 내지 30 μmol 농도의 5-아자데옥시시티딘(5-azadeoxycytidin)을 3 내지 10일간 미리 처리하면 더욱 효과가 좋다.

8> 또한, 상기 신경형성 전사인자를 지속적으로 발현하는 간엽 줄기세포를 시험관 내에서 신경세포로 분화시킬 때에는 간엽 줄기세포의 배양을 위해 통상적으로 사용되는 배지에 N2 보강제(N2 supplement, Gibco)를 추가하여 배양함으로써 분화효율을 높일 수 있다. 상기 간엽 줄기세포의 배양배지에 첨가되는 N2 보강제(100x)는 통상 1:100으로 희석하여 사용하는 것이 바람직하다.

9> 본 발명의 bHLH 계열의 신경형성 전사인자를 발현하는 간엽 줄기세포의 생체내 신경세포로의 분화능을 살펴보기 위하여, 흰쥐의 선조체(striatum)에 뉴로제닌 1을 지속적으로 발현하도록 만든 간엽 줄기세포를 이식한 후 MAP2(microtubul-associated protein 2), NF200(neurofilament-200), NeuN(neuronal nuclei) 등의 신경세포의 마커를 이용하여 면역조직화학 염색을 수행하면, 상기 신경형성 전사인자를 발현하지 않는 간엽 줄기세포를 이식한 경우에 비해 현저하게 높은 비율로 신경세포로 분화함을 확인할 수 있다.

30> 이와 같이, 본 발명의 bHLH 계열 신경형성 전사인자 유전자가 도입된 간엽 줄기세포 또는 상기 간엽 줄기세포로부터 분화된 신경세포는 파킨슨씨병, 알츠하이머, 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측면 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 및 뇌졸중

(stroke)을 포함하는 뇌신경 질환 또는 척수 손상에 의한 장애의 세포 치료 및 유전자 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

- 1> 이 때, 상기 세포 치료용 조성물에 포함되는 과량의 신경세포를 얻는 방법으로는, 먼저 분리한 간엽 줄기세포에 bHLH 전사인자 유전자를 도입하여 선별한 후 이를 시험관 내에서 적절한 조건으로 증식, 분화시켜 얻은 신경세포를 사용하거나 또는 분리된 간엽 줄기세포를 충분히 증식시킨 다음 여기에 bHLH 전사인자 유전자를 도입하고 이를 신경세포로 분화시켜 사용할 수 있다.
- 12> 또한 본 발명의 간엽 줄기세포로부터 형질전환된 신경세포를 이용한 유전자 치료방법의 일 예로서, 상기 간엽 줄기세포 또는 이로부터 분화된 신경세포에서 특정 뇌질환과 관련된 유전자(예컨대; 도파민 합성에 관여하는 타이로신 하이드록시나제 유전자)가 발현될 수 있도록 추가적으로 유전자를 도입하고 상기 간엽 줄기세포 또는 이로부터 분화된 신경세포를 동물의 뇌조직에 이식함으로써 목적하는 유전자를 동물의 신경계 내로 도입하는 방법에 이용될 수도 있다. 따라서 본 발명의 방법에 의해 분화된 신경세포는 유전자를 동물의 신경계 내로 도입하는 유용한 도구가 될 수 있다.
- 33> 본 발명에 방법에 의해 생산된 신경세포를 유효성분으로 하는 치료용 조성물은 공지의 방법에 따라 환자의 생체 내로 주입될 수 있는데, 예를 들어 뵈클룬트와 스테네비(Bjorklund and Stenevi, 1979 Brain Res. 177, 555-560) 또는 린드발 등의(Lindvall et al., 1989 Arch. Neurol 46, 615-31)가 발표한 임상 방법을 이용할 수 있다.
- 34> 상기 신경세포의 1회 투여량은 치료하고자 하는 질환, 질환의 중증도, 투여경로, 환자의 체중, 연령 및 성별 등의 여러 관련 인자를 고려하여 증감이 가능하다.

- 5> 또한, 본 발명은 bHLH 신경형성 전사인자 또는 그 활성절편을 코딩하는 유전자를 포함하는 발현벡터를 포함하는, 간엽 줄기세포를 신경세포로 형질전환시키기 위한 키트를 제공한다.
- 6> 상기에서 bHLH 신경형성 전사인자 유전자를 뉴로제닌 1, 뉴로제닌 2, 뉴로 D1, MASH1, MATH3 및 E47 중에서 선택되는 하나 이상의 유전자 또는 상기 전사인자의 활성절편을 코딩하는 유전자가 사용될 수 있으며, 상기 발현벡터는 레트로바이러스 또는 아데노바이러스에서 유래한 것이 바람직하다. 상기 키트는 포르스콜린 및/또는 5-아자데옥시시티딘을 추가적으로 포함할 수도 있다.
- 17> 이하 본 발명을 하기 실시예에 의하여 좀더 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- 18> 실시예 1: 간엽 줄기세포의 분리 및 배양
- 19> (단계 1) 골수채취 및 간엽 줄기세포의 분리
- 10> 멸균된 15 ml 시험관에 4 ml의 HISTOPAQUE 1077(Sigma사) 및 골수은행(사단법인 한국골수은행협회(KMDP))으로부터 제공받은 골수 4 ml를 조심스럽게 넣은 후, 원심분리기를 이용해서 실온에서 400 x g로 30분간 원심분리하였다. 원심분리 후 파스퇴르 피펫을 이용하여 중간의 혈액연층(buffy coat) 0.5 ml를 조심스럽게 채취하여 멸균된 인산염 완충용액 10 ml가 담긴 시험관에 옮겼다. 다시 250 x g에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고, 10 ml의 인산염 완충용액을 가하여 부드럽게 현탁시킨 후, 10분간 250 x g에서 원심분리하였다. 이 과정을 2회 반복 실시한 후, 최종 침전물을 10% FBS(GIBCO사)가 첨가된 DMEM 배지(Gibco사)에 가하여, 100 ml 동물세포 배양용 용기에 1×10^9 세포가 되도록 분주하였다. 배양용기를 배양기에 넣고 37 °C에서 5% 이산화탄소 및 95% 공기를 공급하면서 4 시간 동안 배양하였다. 이어서 배양용기의

바닥에 달라붙지 않은 세포를 제거하기 위해 상층액을 제거하고 새로운 배지를 가하여 배양기에서 배양하였다.

▷ (단계 2) 간엽 줄기세포의 배양 및 계대배양

▷ (단계 1)에서와 같이 분리한 간엽 줄기세포를 CO₂ 배양기에서 37℃를 유지하면서 간엽 줄기세포 배지(10% FBS(Gibco사) + 10ng/ml bFGF(Sigma사) + 1% 페니실린/스트렙토마이신(Gibco사) + 89% DMEM(Gibco사))에서 배양하였다. 2일 간격으로 배지를 교체하면서 세포를 배양하여, 배양용기에 약 80% 정도 세포가 차게 되면 0.25% 트립신/0.1mM EDTA(GIBCO)를 이용하여 세포를 떨어뜨린 후 배지로 1:20으로 희석한 다음 새로운 배양용기에서 계대배양하였다. 세포 중 일부는 10% DMSO(Sigma사)가 첨가된 배지를 이용하여 동결보관하였다. 도 1은 인간 골수로부터 분리하여 시험관내에서 각각 1일, 2일, 3일 및 7일간 배양한 후 간엽 줄기세포의 형태를 광학현미경상에서 촬영한 사진이다.

3> (단계 3) 간엽 줄기세포의 다분화능

4> 골수로부터 분리한 간엽 줄기세포의 지방세포, 연골세포 및 뼈세포로의 분화능을 다음과 같이 확인하였다.

15> 1) 지방세포로의 분화

16> 간엽 줄기세포를 간엽 줄기세포 배지를 이용하여 배양용기에 가득 차게 배양

한 후, 지방세포 분화유도배지($1\mu\text{M}$ 덤사메타손(dexamethasone, Sigma사), 0.5mM 메틸-이소부틸잔틴(Sigma사), 인슐린($10\mu\text{g}/\text{ml}$, Gibco사), 100nM 인도메타신(indomethacin, Sigma사), 및 10% FBS(Gibco사)를 함유하는 DMEM(Gibco사) 배지)에서 48시간 배양한 후, 지방세포 유지배지($10\mu\text{g}/\text{ml}$ 인슐린 및 10% FBS를 함유하는 DMEM 배지)에서 1주일 간 배양한 후 오일 레드 O(oil red O) 염색을 실시하여 도 2A에 나타내었다. 여기에서 보듯이 오일레드 O에 의해 붉게 염색되어진 지방방울이 세포내에 생성되었으므로 간엽 줄기세포가 지방세포로 분화되었음을 알 수 있었다.

7> 2) 연골세포로의 분화

8> 간엽 줄기세포를 간엽 줄기세포 배지를 이용하여 배양용기에서 배양한 후, 트립신으로 세포를 떼어 낸 다음 2×10^5 세포를 시험관에 옮겨 원심분리한 후, 0.5 ml 의 무혈청 연골세포 분화 유도배지(50 ml 고-글루코스 DMEM(Gibco사), 0.5 ml $100 \times$ ITS($0.5\text{ mg}/\text{ml}$ 소 인슐린, $0.5\text{ mg}/\text{ml}$ 인간 트랜스페린, $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ 셀렌산 나트륨; Sigma사), $50\mu\text{l}$ 리놀렌산-알부민(Sigma사), 0.2mM 100 nM 덤사메타손(Sigma사), 및 $10\text{ ng}/\text{ml}$ TGF- $\beta 1$ (Sigma사))를 가한 후 배양하였다. 배지를 3일 간격으로 교체하면서 3주간 배양한 후, 4% 파라포름알데히드 용액으로 고정하고, 박절기(microtome)로 절편을 만든 후 알시안 블루(alcian blue) 염색을 실시하여 도 2B에 나타내었다. 여기에서 보듯이, 알시안 블루 염색액에 연골세포의 세포 밖의 연골기질성분이 파랗게 염색되는 사실과 연골소강(lacuna)내에 연골세포가 존재하는 것으로부터 간엽 줄기세포가 연골세포로 분화되었음을 확인할 수 있다.

19> 3) 뼈세포로의 분화

50> 간엽 줄기세포를 간엽 줄기세포 배지를 이용하여 배양용기에 가득 차게 배양한 후, 뼈세포 분화유도배지(10 mM β -글리세롤 포스페이트(Sigma사), 0.2 mM 아스코르베이트-2-포스페이

트(Sigma사), 10nM 덱사메타손(Sigma사) 및 10% FBS(Gibco사)를 함유하는 DMEM 배지)에서, 3일간격으로 배지를 교체하면서 2주간 배양하였다. 배양 후 4% 파라포름알데히드 용액으로 고정하고 폰 코사(von Kossa) 및 알칼린 포스파타제 염색을 실시하여 각각 도 2C 및 2D에 나타내었다. 여기에서 보듯이, 세포내 알칼린 포스파타제 활성의 증가 및 폰 코사 염색을 통한 히드로시아파타이트(hydroxyapatite) 형태의 칼슘이 세포외부에 축적되는 사실로부터 간엽 줄기세포가 뼈세포로 분화되었음을 확인할 수 있다.

1> 실시예 2 : 신경 전사인자 뉴로제닌 1의 레트로바이러스 벡터 제작

2> (단계 1) 뉴로제닌 1 레트로바이러스 벡터 제작

3> 서열번호: 1 및 2의 올리고뉴클레오타이드를 이용하여 Balb/c 생쥐로부터 추출한 DNA를 주형으로 PCR을 통해 얻어진 산물을 TOPO TA 클로닝 키트(Invitrogen)를 이용하여 클로닝하였다. 클로닝된 벡터의 염기서열 분석을 통하여 뉴로제닌 1 유전자가 벡터내에 포함되어 있음을 확인하고, *EcoRI* 제한효소로 절단하여 뉴로제닌 1 유전자만을 잘라 내었다. 잘라 낸 뉴로제닌 1 유전자를 *EcoRI*로 절단한 pMSCV-puro 벡터(Clontech사)와 함께 T4 DNA 리가제(Roche사)로 결합시킨 후 대장균 DH5 α에 형질도입시켜 최종적으로 pMSCV-puro 벡터에 뉴로제닌 1(neurogenin1; Ngn1) 유전자가 삽입된 pMSCV-puro/Ngn1 벡터를 제작하였다. 이 벡터의 유전자 지도는 도 3에 나타내었다.

34> (단계 2) 뉴로제닌 1 레트로바이러스 벡터의 발현 확인

35> pMSCV-puro/Ngn1 벡터를 칼슘 포스페이트 침전법으로 293T/17 세포(ATCC사 CRL-11268)에 형질도입하여 48 시간 경과 후, 세포를 세포질과 핵 분획으로 나누었다. 각 분획을 뉴로제닌 1 항체(Chemicon)를 이용하여 웨스턴 블롯을 통해 발현을 확인하였다. 그 결과는 도 4에 나타

내었으며, pMSCV-puro/Ngn1 벡터가 도입된 293T/17 세포의 핵분획에서 뉴로제닌 1 단백질의 발현을 확인할 수 있었다.

6> (단계 3) 뉴로제닌 1을 갖는 레트로바이러스 제작

7> pMSCV-puro/Ngn1 벡터를 칼슘 포스페이트 침전법으로 레트로바이러스 포장(packaging) 세포인 PA317(ATCC CRL-9078)또는 PG13(ATCC CRL-10686)세포에 형질도입하여 48시간 경과 후, 배양액만을 얻어 0.45 μ m 여과막으로 여과하여 레트로바이러스 용액을 얻었다. 레트로바이러스 용액은 분주하여 -70℃에 보관하여 사용하였다.

8> 실시예 3 : 간엽 줄기세포로 전사인자 뉴로제닌 1의 도입

9> 간엽 줄기세포를 100 mm 배양용기에 70%정도 차게 배양한 후, 실시예 2에서 얻은 4 ml의 뉴로제닌 1 레트로바이러스 용액에 폴리브렌(polybrene, Sigma사) 8 μ g/ml이 첨가된 용액을 가하여 8 시간 동안 배양하였다. 이어서 레트로바이러스 용액을 제거하고 10 ml의 간엽 줄기세포 배지를 가하여 24 시간 동안 배양한 후, 다시 레트로바이러스를 감염시켰다. 이 과정을 1-4회 반복한 후, 최종적으로 간엽 줄기세포를 트립신으로 떼어내어 1:20으로 희석하여 계대배양하였다. 계대배양 시 푸로마이신(puromycin, Sigma사)을 2 μ g/ml 이 되도록 배지에 첨가하여 레트로바이러스가 감염된 세포만이 살아남을 수 있도록 2주간 선별하였다. 최종적으로 푸로마이신에 저항성을 갖는 간엽 줄기세포에서 뉴로제닌 1의 발현은 뉴로제닌 1 항체를 이용한 웨스턴 블랏을 통해 확인하였으며, 그 결과는 도 5에 나타내었다. 여기에서 보듯이, 뉴로제닌 1 유전자가 도입된 간엽 줄기세포의 핵분획에서 뉴로제닌 1이 발현됨을 확인할 수 있었다.

60> 실시예 4 : 시험관내(*in vitro*)에서 뉴로제닌 1을 발현하는 간엽 줄기세포로부터 신경세포의 분화

- 1> 시험관내에서 뉴로제닌 1을 지속적으로 발현하는 간엽 줄기세포(MSC/ngn1)로부터 신경세포의 분화를 유도하기 위해, 5×10^3 개 세포를 폴리-D-리신과 콜라젠 혼합물(각각 0.1mg/ml이 포함된 혼합물)로 미리 코팅된 직경 12mm 커버글라스에 놓아 세포가 붙도록 하여 배양하였다. 이어서, 5-아자데옥시시티딘(Sigma사)을 10 μ g/ml이 되도록 첨가하여 간엽 줄기세포 배지에서 3내지 7 일간 배양하고, 다시 F12/DMEM(Gibco사)배지에 10 μ mol/l 의 포르스콜린(Sigma사)과 N2보강제(100x, Gibco사)가 1:100으로 희석하여 첨가된 배지에서 1주간 더 배양하였다.
- 2> 상기 신경세포로 분화유도된, 뉴로제닌 1을 지속적으로 발현하는 간엽 줄기세포의 분화 확인은 면역조직화학 염색법으로 확인하였다.
- 3> 즉, 면역조직화학 염색법을 수행하기 위해 일차 항체로 1:200으로 희석한 MAP2 단클론항체(Sigma), 1:400으로 희석한 NF200 다클론항체(Sigma) 또는 1:100으로 희석한 NeuN 단클론 항체(Chemicon)를 사용하였고, 상기 일차 항체를 검출하기 위하여 형광 표지된 이차 항체(Vector사)를 제조회사의 지침서에 따라 사용하였다.
- 34> 구체적으로, 세포를 인산염 완충액(PBS)으로 세척 후, 4% 파라포름알데히드용액으로 상온에서 20분간 고정시켰다. 상기 고정된 세포를 PBS로 3회 세척하고, 10% 정상 말 혈청(normal horse serum; NHS) 및 0.1% 트리톤 X-100을 포함하는 PBS에 넣고 상온에서 2 시간 동안 블로킹하였다. 일차 항체를 10% NHS 함유 PBS에 넣고 4℃에서 하룻밤 동안 반응시켰다. 0.1% 트리톤 X-100 함유 PBS로 10분씩 3회 세척하고, PBS에 이차 항체를 넣어 상온에서 1시간 반응시킨 후 0.1% 트리톤 X-100 함유 PBS로 10분씩 3회 세척하였다.
- 35> 그 결과는 도 6에 나타내었으며, 여기에서 보듯이, 뉴로제닌 1을 지속적으로 발현하는 간엽 줄기세포에서 길다란 신경돌기(neurite)의 성장을 확인할 수 있고, 이러한 신경돌기는 신경돌기에 특이적으로 반응하는 항체 NF200, MAP2에 양성으로 염색되며, 또한 뉴로제닌 1을 지

속적으로 발현하는 간엽줄기세포에서 신경세포의 핵에 특이적으로 반응하는 NeuN 항체에 양성인 세포를 관찰할 수 있었다.

6> 실시예 5 : 시험관내(*in vitro*)에서 뉴로제닌 1과 E47 또는 뉴로 D1과 E47을 발현하는 간엽 줄기세포로부터 신경세포의 분화

7> 시험관내에서 간엽 줄기세포에 뉴로제닌 1 또는 뉴로 D1을 발현시킴으로써 신경세포의 분화정도를 확인하기 위하여, 실시예 2에서 제작된 뉴로제닌 1 발현벡터에서 뉴로제닌 1 유전자 대신에 뉴로 D1 유전자(Genbank Accession No.: U67776) 또는 E47 유전자(Genbank Accession No.: AF352579)를 삽입하여 뉴로 D1 발현벡터 및 E47 발현벡터를 각각 제작하였다. 2×10^5 개 세포가 들어있는 100mm 배양용기에 뉴로제닌 1 발현벡터 $4\mu\text{g}$ + E47 발현벡터 $1\mu\text{g}$ 또는 뉴로 D1 발현벡터 $4\mu\text{g}$ + E47 발현벡터 $1\mu\text{g}$ 을 각각 ExGEN500 (MBI Fermenta사) $16\mu\text{l}$, 1ml의 0.1mM NaCl 용액의 혼합액에 가하여 2시간 동안 형질도입한 후, 배지를 간엽 줄기세포 배지로 교체하였다. 24시간이 경과한 후 배지를 F12/DMEM(Gibco사) 배지에 N2 보강제(100x, Gibco사)가 1:100으로 희석하여 첨가된 배지로 교체하여 2일간 더 배양하였다. 배양된 세포에서 신경세포의 마커인 NF200(neurofilament200, Chemicon사), NF-M(neurofilament-M, Zymed사) 및 β -튜불린 III(BAbCO사)가 발현되는지는 배양액을 NF200에 대한 항체, NF-M에 대한 항체 및 β -튜불린 III에 대한 항체와 반응시키는 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다.

38> 그 결과는 도 7에 나타내었으며, 뉴로제닌 1과 E47 또는 뉴로 D1과 E47이 간엽 줄기세포에서 발현됨으로써, 신경세포의 마커인 NF200과 NF-M 단백질의 발현양이 증가하므로 간엽 줄기세포가 신경세포로 분화하였음을 알 수 있었다. β -튜불린 III 단백질은 신경세포 특이적인 단백질로 알려져 있으나, 미분화상태의 간엽줄기세포에서도 이 단백질이 발현되고 있기 때문에 신경세포의 마커로 확인하기는 힘들음을 알 수 있다.

3> 실시예 6 : 뉴로제닌 1을 발현하는 간엽 줄기세포의 생체내 신경세포로의 분화

0> (단계 1) 이식용 간엽 줄기세포의 제조

1> 생체내에 이식할 뉴로제닌 1을 발현하는 간엽 줄기세포는 실시예 3과 같이 준비하였다. 한편, 뉴로제닌 1 유전자가 간엽 줄기세포의 생체내 이식물과 신경세포로의 분화를 증가시키는 지 여부를 확인하기 위해 대조군으로서 β -갈락토시다제를 발현하는 간엽 줄기세포(MSC/lacZ)를 제조하였으며, 이는 실시예 2의 레트로바이러스 벡터 제작과정에서 *ngn1* 유전자 대신 *lacZ* 유전자를 삽입하여 제조된 벡터로 간엽 줄기세포를 형질감염시켜 제조하였다. 이와 같이 준비된 *lacZ* 또는 *ngn1* 유전자를 발현하는 간엽줄기세포를 생체내 이식한 후 확인하기위한 방법으로 Hoechst 33258(Molecular probe사)로 전염색(pre-stain)하였다. Hoechst 33258 전 염색은 *lacZ* 또는 *ngn1* 유전자를 발현하는 간엽 줄기세포의 배지에 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 Hoechst 33258를 24시간 동안 첨가하여 배양함으로써 수행하였다. 전 염색과정 후 *lacZ* 또는 *ngn1* 유전자를 발현하는 간엽 줄기세포를 0.25% 트립신/0.1% EDTA(Gibco사)로 떼어낸 후 $1\mu\text{l}$ 당 3×10^3 세포를 포함하도록 PBS(Gibco사)로 희석하여 생체이식에 사용하였다.

2> (단계 2) 생체이식(transplantation)

3> 스프라그-다울리(Sprague-Dawley)계 성숙한 흰쥐 암컷(250g)((주)대한바이오링크)을 이용하여 이식시험을 수행하였다.

4> 먼저, $350 \text{ mg}/\text{kg}$ 의 클로랄 하이드레이트(chloral hydrate, Sigma사)를 복강에 주입하여 흰쥐를 마취시킨 후, 절개할 부위의 털을 깎았다. 이를 정좌표로 삽입하기 위한 틀(stereotaxic frame)에 귀와 입을 고정시켜 세포 주입시에 흰쥐가 움직이지 않게 확실하게 고정하였다. 절개할 머리부분을 70% 에탄올로 소독하고, 정수리 부분 1 cm 정도를 수직으로 절

개하였다. 이어서, 10 μ l 헤밀턴 주사기에 MSC/lacZ 또는 MSC/ngn1 3×10^3 세포가 포함된 PBS 1 μ l를 넣고 헤밀턴 주사기 결이에 부착시켰다. 정수리점(bregma)을 찾고 정수리점 + 1, ML 3, LV +4 좌표의 위치를 찾고 표시하였다. 표시된 부위를 드릴을 이용하여 두개골만을 뚫어 경질막(dura)을 노출시킨 후, 헤밀턴 주사기로 정확한 좌표에 맞춘 후 0.2 μ l/분의 속도로 세포를 주입시켰다. 1 μ l의 세포를 주입한 후 20분 정도 머물러 있다가 아주 천천히 주사기를 제거하였다. 주사기를 제거한 후 절개부분을 소독된 봉합실과 바늘을 이용하여 봉합하고 소독약으로 소독하였다. 이로부터 뇌를 꺼내기 전까지 하루에 한번씩 면역억제제인 사이클로스포린 A(cyclosporin A)(Sigma사) 5 mg/kg을 복강에 주입하였다.

'5> (단계 3) 조직절편 제작

'6> 흰쥐들을 에틸 에테르로 마취시킨 후, 가슴을 열고 좌심실에 주사바늘을 삽입한 후 생리 식염수로 관류세척하고, 0.1M 인산염 완충액(PBS, pH 7.4)에 녹인 파라포름알데히드 용액으로 관류고정한 다음, 뇌를 적출하여 동일한 고정액에 담가 4℃에서 16 시간 동안 후고정(post-fixation)하였다. 후고정된 뇌를 30% 슈크로즈에 넣고 24 시간 이상 침적시킨 후 꺼내어 슬라이딩 박절기(sliding microtome)를 이용하여 35 μ m 두께로 조직을 연속절단하여 이를 Silane이 코팅된 슬라이드(MUTO PURE CHEMICALS CO., LTD사, Japan)에 붙여주고 PBS에 담가 4℃에서 저장하였다.

'7> 도 8은 lacZ 또는 ngn1 유전자가 도입된 간엽 줄기세포를 흰쥐 뇌의 선조체(striatum)에 이식하여, 2주가 경과한 후 이식율을 확인하기 위하여 Hoechst 33258 형광을 확인할 수 있는 자외선필터를 이용하여 촬영한 형광사진이며 이의 이식률(%)은 하기 표 1에 나타내었다.

8> 【표 1】

	이식률(%)
MSC	45
MSC/Ngn1	54

9> 도 8 및 표 1에서 볼 수 있는 바와 같이, MSC/Ngn1이 이식된 경우 MSC/lacZ 보다 높은 이식률을 나타내므로 뉴로제닌 1을 발현하는 간엽 줄기세포가 세포치료용으로 효과적임을 알 수 있다.

10> (단계 4) 면역조직화학형광염색법(immunohistochemistry)

11> 조직절편이 붙어있는 슬라이드를 1 x PBS/0.1% 트리톤X-100에 30 분간 담가두었다. 면역염색의 첫 단계로 비특이적 반응을 줄이기 위해 10% 정상 말혈청(normal horse serum)을 넣어 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 일차 항체는 1:400으로 희석한 NeuN 단클론 항체 (Chemicon사)과 1:400으로 희석한 GFAP 다클론 항체(Sigma사)를 사용하였으며, 상온에서 2 시간 동안 반응시켰다. 이어서 1 x PBS/0.1% 트리톤X-100으로 15분씩 3회 세척하였으며, 상기 일차 항체를 검출하기 위하여 형광 표지된 이차 항체(Vector사)를 제조회사의 지침서에 따라 사용하였다. 조직 안에 주입한 세포들은 Hoechst 33258에 의해 전염색이 되어 있으므로 이는 자외선 필터를 통해 관찰할 수 있었다.

32> 도 9 및 도 10에서 보듯이, 뉴로제닌 1을 지속적으로 발현하는 간엽 줄기세포가 대조군 (MSC/lacZ)에 비하여 현저하게 높은 비율로 신경세포로 분화하였음을 확인하였다. lacZ를 지속적으로 발현하는 간엽줄기세포의 경우 성상세포(astrocyte)의 마커인 GFAP에 양성으로 염색 되는 세포가 약 45%정도이고, 신경세포의 핵을 특이적으로 염색하는 마커인 NeuN 항체에 대해

양성으로 염색되는 세포가 약 12%정도로, Ngn1을 지속적으로 발현하는 간엽 줄기세포에 비해 상대적으로 높은 비율로 성상세포로 분화하였음을 알 수 있다. 반면, Ngn1을 지속적으로 발현하는 간엽 줄기세포의 경우 생체내에서 신경세포로의 분화정도가 NeuN에 양성인 세포로 확인하였을 경우 약 48%정도이고, 성상세포로의 분화정도는 약 13%였다.

- 83> 상기 결과로부터 뉴로제닌 1의 발현에 의해 간엽 줄기세포가 성상세포로의 분화는 억제되고, 신경세포로 분화가 촉진되었음을 알 수 있었다.

【발명의 효과】

- 84> 본 발명의 방법에 의해 간엽 줄기세포를 우수한 효율로 신경세포로 분화시킬 수 있으며, 분화 및 증식된 신경세포는 파킨슨씨병, 알츠하이머, 뇌졸중 등의 뇌신경 질환과 척수손상에 의한 장애 등을 치료하기 위한 세포 대체 요법과 유전자 치료요법에 이용되거나, 신약개발에 있어 약물효과 검정 또는 각종 연구를 위한 재료로 폭넓게 이용될 수 있다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

간엽 줄기세포에서 염기성 나선-고리-나선(basic helix-loop-helix, bHLH) 계열의 신경형성 전사인자의 농도를 높이는 단계를 포함하는, 간엽 줄기세포를 신경세포로 형질전환(transdifferentiation)시키는 방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서,

상기 bHLH 계열의 신경형성 전사인자가 뉴로제닌 1(Neurogenin 1), 뉴로 D1(neuro D1), MASH1, MATH3 또는 E47 중에서 선택되는 하나 이상의 전사인자 또는 이들의 활성절편인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 3】

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

bHLH 계열의 신경형성 전사인자 또는 이들의 활성절편을 코딩하는 유전자를 간엽 줄기세포로 도입하여 발현시키는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 4】

제 3 항에 있어서,

bHLH 계열의 신경형성 전사인자 또는 이들의 활성절편을 코딩하는 유전자를 포함하는 바이러스 벡터로 간엽 줄기세포를 형질감염시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 5】

제 3 항에 있어서,

상기 간엽 줄기세포를 추가적으로 포르스콜린 및 5-아자데옥시시티딘 중에서 선택되는 하나 이상의 물질로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 6】

제 5 항에 있어서,

10 내지 30 μmol 농도의 포르스콜린으로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 7】

제 5 항에 있어서,

5 내지 30 μmol 농도의 5-아자데옥시시티딘(5-azadeoxycytidin)으로 3 내지 10일간 처리한 후
10 내지 30 μmol 농도의 포르스콜린(forskolin)으로 처리하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 8】

제 1 항에 있어서,

간엽 줄기세포의 배양 배지에 N_2 보강제를 추가로 첨가하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 9】

bHLH 계열 신경형성 전사인자 유전자가 도입된 간엽 줄기세포 또는 상기 간엽 줄기세포로부터 분화된 신경세포를 유효성분으로 하는, 신경 질환에 대한 세포 치료용 조성물.

【청구항 10】

제 9 항에 있어서,

신경 질환이 파킨슨씨병, 알츠하이머, 헌팅톤병(Huntington's disease), 근위축성 측면 경화증(amyotrophic lateral sclerosis) 및 뇌졸중(stroke)을 포함하는 신경 질환 중 하나이거나 척수손상에 의한 장애인 것을 특징으로 하는, 세포 치료용 조성물.

【청구항 11】

제 9 항에 있어서,

신경세포는 간엽 줄기세포에 bHLH 계열의 신경형성 전사인자 또는 그 활성절편을 코딩하는 유전자를 도입한 후 증식 및 분화시켜 얻어지거나, 또는 간엽 줄기세포를 증식시킨 후 상기 유전자를 도입하여 분화시켜 얻어지는 것을 특징으로 하는, 세포 치료용 조성물.

【청구항 12】

bHLH 계열의 신경형성 전사인자 또는 그 활성절편을 코딩하는 유전자를 함유하는 발현벡터를 포함하는, 간엽 줄기세포를 신경세포로 분화시키기 위한 키트.

【청구항 13】

제 12 항에 있어서,

bHLH 계열의 신경형성 전사인자는 뉴로제닌 1, 뉴로 D1, MASH1, MATH3 또는 E47인 것을 특징으로 하는 키트.

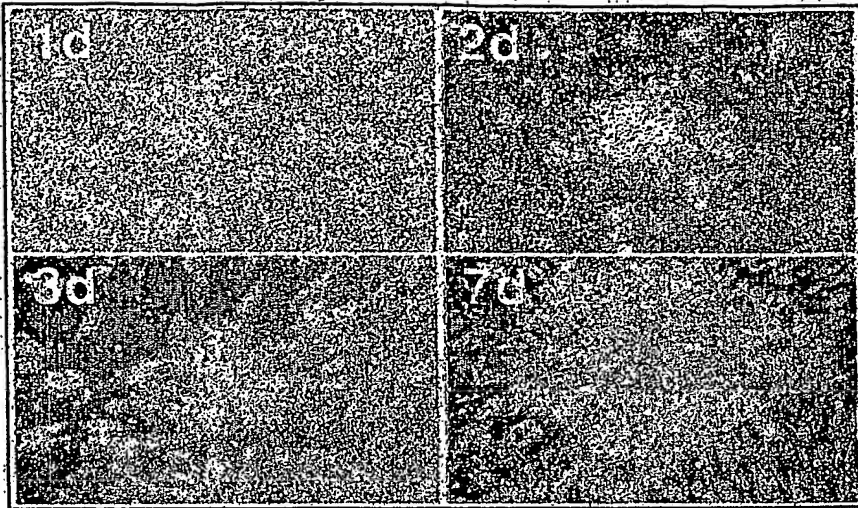
【청구항 14】

제 12 항 또는 제 13 항에 있어서,

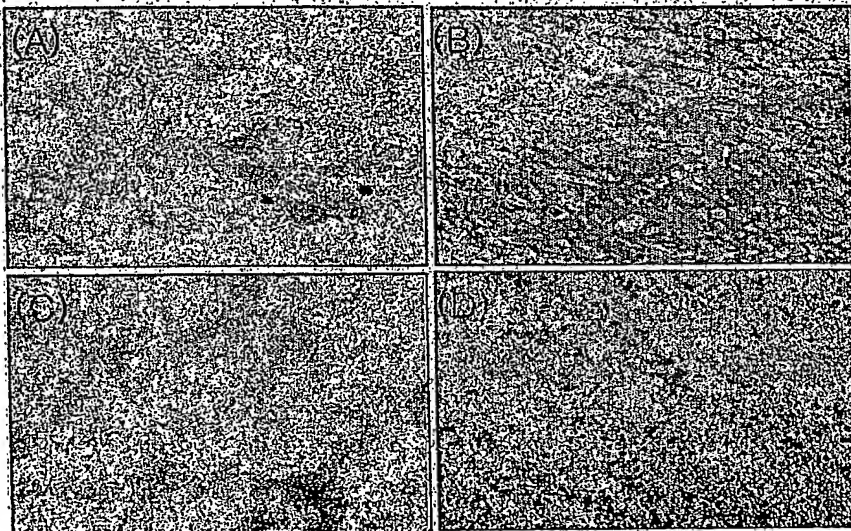
포르스콜린 또는 5-아자데옥시시티딘을 추가적으로 포함하는 키트.

【도면】

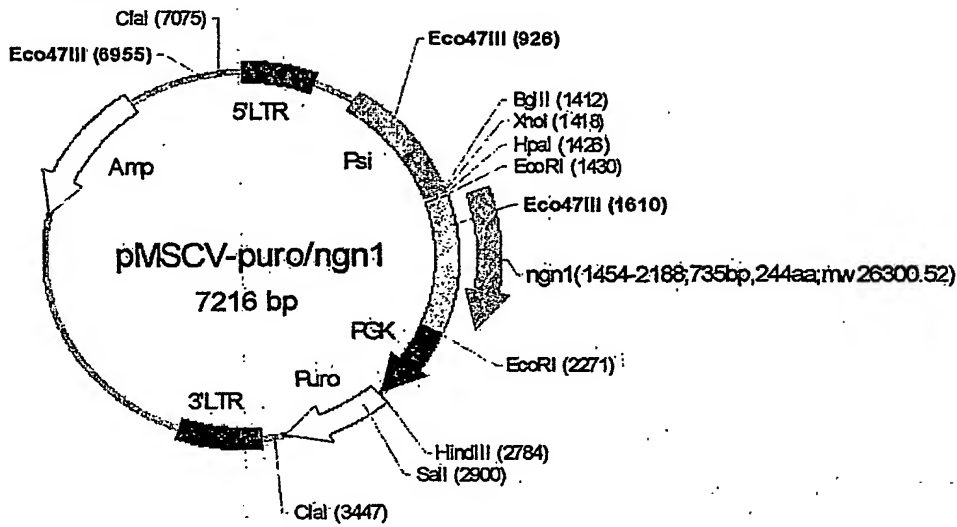
【도 1】



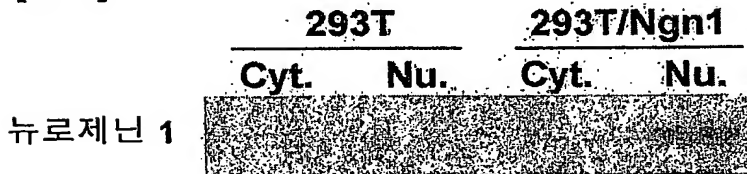
【도 2】



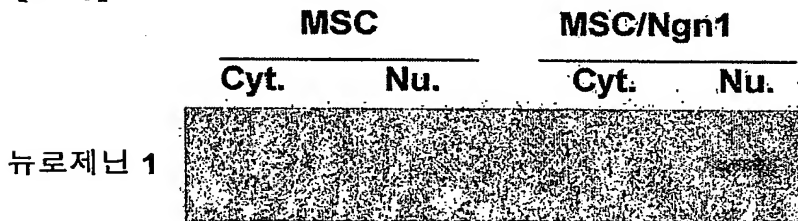
【도 3】



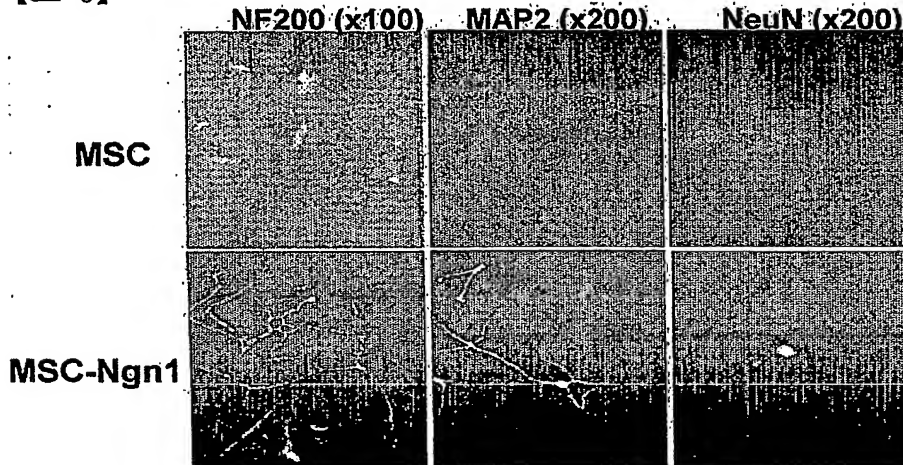
【도 4】



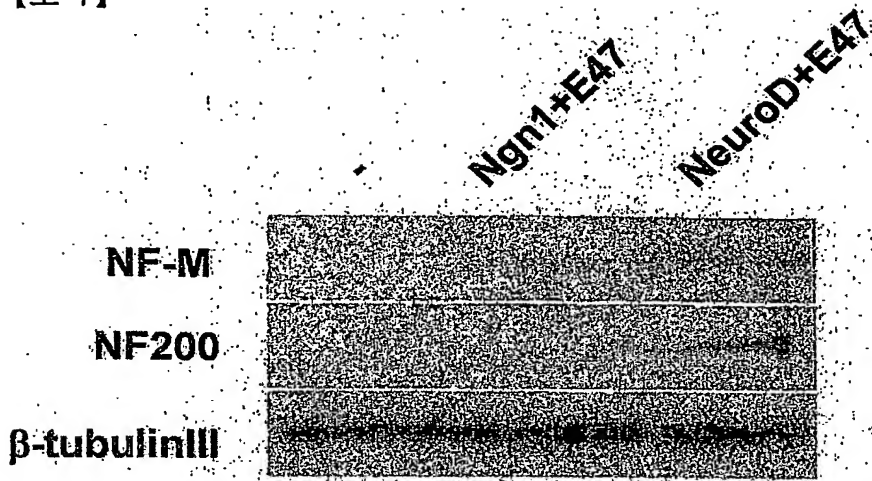
【도 5】



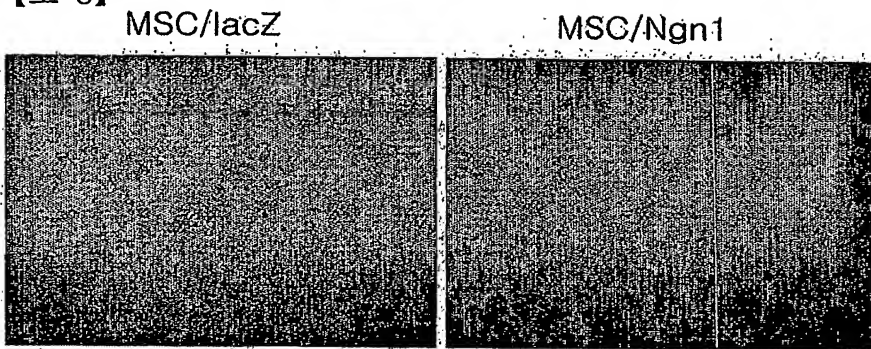
【도 6】



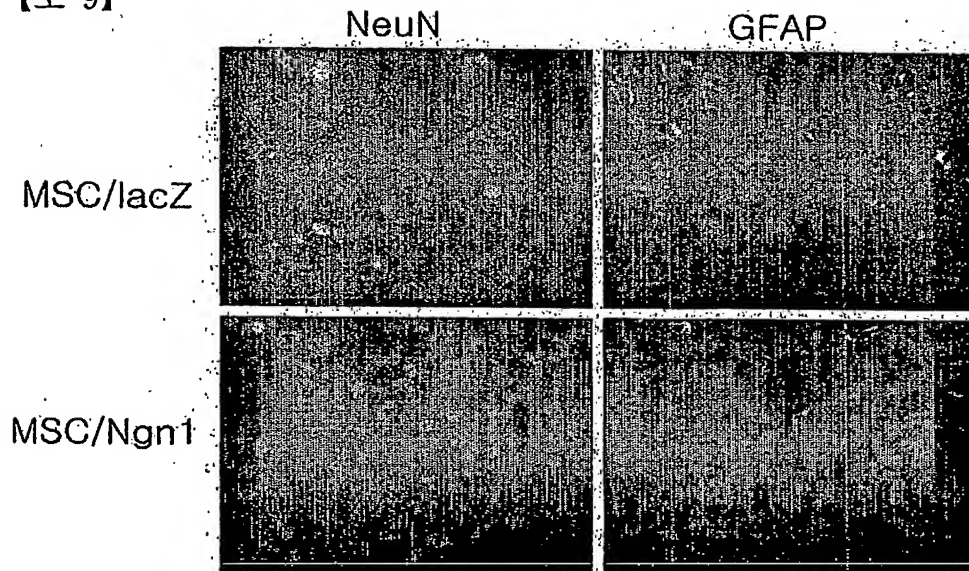
【도 7】



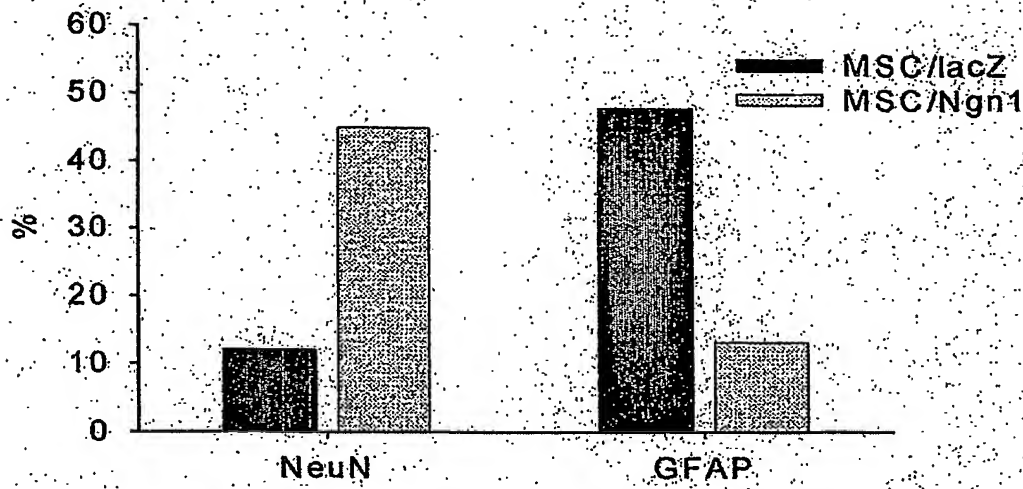
【도 8】



【도 9】



【도 10】



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.